Editorial
On line

SOCIETAT D'HISTÒRIA
NATURAL DE LES BALEARS

Degradació aeròbica d'hidrocarburs aromàtics per *Pseudomonas* i Roseobacters

Rafael BOSCH, Isabel BRUNET-GALMÉS, Maria MAS-LLADÓ, Catalina María ALEJANDRO-MARÍN, Daniel JAEN-LUCHORO, Claudia PRINCE, Cristina RAMON, Antonio BUSQUETS, Margarita GOMILA, Magdalena MULET, Arantxa PEÑA, Antonio BENNASAR, Elena GARCÍA-VALDÉS, Balbina NOGALES i Jorge LALUCAT

Grup de Recerca en Microbiologia
Universitat de les Illes Balears
Carretera de Valldemossa km 7,5. 07122-Palma de Mallorca
E-mail: rbosch@uib.es

El grup de recerca en Microbiologia de la Universitat de les Illes Balears (Micro-UIB) ha treballat en Microbiologia Ambiental des de mitjans dels anys vuitanta del segle passat. La plana web del grup (http://www.uib.cat/recerca/estructures/grups/grup/MICROBIO/) recull que la seva recerca s'ha centrat en tres línies principals: "Avaluació dels conceptes i definicions de tàxons bacterians", "Anàlisi de comunitats microbianes i de microorganismes ecològicament rellevants" i "Microbiologia de la pol·lució ambiental". Així, els investigadors de Micro-UIB han explorat la diversitat bacteriana, en termes de taxonomia i fisiologia, de diversos ecosistemes de més de 20 localitats geogràfiques diferents. La seva contribució en taxonomia ha donat lloc a la descripció de quasi 50 espècies bacterianes noves. També han explorat la fisiologia de bacteris cultivables emprant

aproximacions bioquímiques i genètiques. A més a més, han començat a aplicar les tecnologies d'alt rendiment (genòmica i proteòmica) a l'estudi dels seus microorganismes model. La present editorial resumeix les contribucions científiques del grup en el camp de recerca de la degradació aeròbica d'hidrocarburs aromàtics per membres del gènere *Pseudomonas* i del grup *Roseobacter*, i descriu els reptes del grup per a la propera dècada en aquest camp de recerca.

La minoria cultivable: el gènere *Pseudomonas* i el grup *Roseobacter*

La microbiologia ambiental pot ésser definida com l'estudi dels microorganismes a l'ambient, analitzant quins microorganismes hi ha, quina és la mida de les seves poblacions i quin és el paper que realitzen als ecosistemes on es troben. L'aproximació clàssica per a donar resposta a dites preguntes és l'aïllament de microorganismes en cultiu pur i la seva posterior caracterització genètica, fisiològica i taxonòmica. Malgrat això, s'ha postulat que tan sols es pot cultivar una petita fracció de la comunitat (menys de l'1% de mitjana) (Stewart, 2012). Seguint aquesta estratègia, les primeres publicacions del grup es varen centrar en l'aïllament i la identificació de bacteris degradadors d'hidrocarburs que tenien un paper clau en la degradació de contaminants. L'estratègia d'aïllament emprada pels investigadors (enriquiment i creixement amb hidrocarburs com a font única de carboni i energia) va donar com a resultat una àmplia col·lecció d'aïllats, la major part d'ells afiliats al gènere *Pseudomonas*, que eren capaços de catabolitzar hidrocarburs (Ferrer *et al.*, 1986; García-Valdés *et al.*, 1988; Rosselló-Mora *et al.*, 1994b, Mulet *et al.*, 2011). Els membres del gènere *Pseudomonas* són bacteris generalistes amb una gran versatilitat metabòlica que els hi confereix un enorme potencial d'adaptació a condicions ambientals fluctuants (Silby *et al.*, 2011). Com a conseqüència evolutiva, al gènere *Pseudomonas* s'ha descrit una gran diversitat biològica en termes d'espècies bacterianes distintes (Mulet *et al.*, 2010; Palleroni i Moore, 2004). Així, i fins a la data d'avui, *Pseudomonas* és el gènere de bacteris Gram negatius amb el major nombre d'espècies vàlidament descrites (140 espècies a febrer 2014) atenent a la referència en el camp: "Euzeby's List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" (http://www.bacterio.net/pseudomonas.html).

És interessant el fet que la major part dels aïllats analitzats pels investigadors de Micro-UIB es varen afiliar a l'espècie *Pseudomonas stutzeri* (García-Valdés *et al.*, 1988; Rosselló-Mora *et al.*, 1994b). En conseqüència, els investigadors varen realitzar un gran esforç per a aclarir la taxonomia de dits aïllats emprant la major part de les tècniques taxonòmiques disponibles: hibridació DNA-DNA (Rosselló *et al.*, 1991), serologia (Rosselló *et al.*, 1992), anàlisi bioquímica i quimiotaxonòmica (Rosselló-Mora *et al.*, 1994a), filogènia basada en el ARNr 16S (Bennasar *et al.*, 1996), electroforesi en gel de camp polsat (Ginard *et al.*, 1997), anàlisi dels espaiadors del ARNr (Guasp *et al.*, 2000), anàlisi d'electroforesi d'enzims amb múltiples *loci* (Rius *et al.*, 2001), anàlisi de seqüències d'ADN multi *loci* (Cladera *et al.*, 2004), siderotipat (Mulet *et al.*, 2008), i MALDI-TOF de cèl·lules senceres (Scotta *et al.*, 2013). Així, els aïllats obtinguts per Micro-UIB s'han agrupat finalment en 22 genomovars -grups de soques que es poden diferenciar genòmica i filogenèticament però són indistingibles fenotípicament (Ursing *et al.*, 1995)- dintre de l'espècie *P. stutzeri* (Rosselló *et al.*, 1991; Rosselló-Mora *et al.*, 1996; Guasp *et al.*, 2000; Sepúlveda-Torres *et*

al., 2001; García-Valdés *et al.*, 2003; Sikorski *et al.*, 2005; Mulet *et al.*, 2008; Scotta *et al.*, 2013) i s'ha descrit una espècie nova: *Pseudomonas balearica* (Bennasar *et al.*, 1996).

En referència al potencial catabòlic d'hidrocarburs aromàtics, la comunitat científica ha descrit aïllats de l'espècie *P. stutzeri* capaços de metabolitzar benzoat (i derivats halogenats), 4-hidroxibenzoat, benzí-sulfonat (i derivats metilats), carbazol, cresol, dibenzotiofè, fluorantè, fluori, indè, naftalè (i derivats metilats i clorats), PCBs, fenantrè, fenol (i derivats metilats), pirè, quinolina, salicilat (i derivats metilats i clorats), tetralina, toluat, toluè i xilè (Lalucat *et al.*, 2006 i referències de la revisió). En aquest camp, els investigadors de Micro-UIB han descrit l'aïllament de soques de *P. stutzeri* degradadores de benzoat, cloronaftalè, clorosalicilat, metil-naftalè, metil-salicilat, naftalè, salicilat, toluat i/o xilè (García-Valdés *et al.*, 1988; 2003; Rosselló-Mora *et al.*, 1994b). D'elles, l'aïllat més ben analitzat és *P. stutzeri* AN10, del que es coneix la seva via de degradació de naftalè (Fig. 1). Els gens que codifiquen per als enzims de la via es troben estructurats en quatre operons: *nahAaAbAcAdBFCED*, que codifica els enzims involucrats a la conversió de naftalè a salicilat (Amengual, 1992; Bosch *et al.*, 1999a); *nahGTHINLOMKJ*, que codifica els enzims responsables de la conversió de salicilat a catecol (transformació realitzada per la salicilat 1-hidroxilasa NahG) i la seva posterior ruptura *meta* induïda per la catecol 2,3-dioxigenasa (NahH) que el canalitza al cicle de l'àcid tri-carboxílic (Bosch *et al.*, 2000); *nahW*, que codifica per a una salicilat 1-hidroxilasa addicional (Bosch *et al.*, 1999b) que permet la conversió efectiva del salicilat produït durant la degradació de naftalè a catecol, evitant així el seu efecte tòxic (Lanfranconi *et al.*, 2009); i el darrer que codifica el gen regulador *nahR* (Bosch *et al.*, 2000), responsable de l'activació transcripcional dels operons catabòlics en presència de salicilat. És interessant esmentar que vora la via catabòlica es varen trobar diverses Seqüències d'Inserció (SIs) -elements genètics mòbils molt freqüents a bacteris (per informar-se, visitar el lloc web "IS-Finder" a https://www-is.biotoul.fr/)-. Una d'elles, IS*Pst9*, va resultar ésser essencial per *P. stutzeri* AN10 en l'adquisició de la capacitat de degradar cloro-salicilats (Ginard, 1997; Christie-Oleza *et al.*, 2008) degut a la inactivació gènica produïda al seu genoma que va permetre l'adient degradació de cloro-catecol. Aquesta evidència experimental va suggerir que les SIs tenien un paper rellevant a l'adaptació de *P. stutzeri* AN10 a la presència d'hidrocarburs. Per aquest motiu, els investigadors de Micro-UIB varen engegar experiments evolutius de llarga durada amb la soca AN10 com a microorganisme model i salicilat com a hidrocarbur de referència. Els resultats obtinguts demostraren que la mobilització de les SIs produïren inactivació gènica i reorganitzacions genòmiques que foren claus per a l'adaptació de la soca AN10 a créixer a altes concentracions de salicilat (fins a 36 mM) (Martín-Cardona, 2009).

Durant la darrera dècada, els investigadors del grup Micro-UIB han fet un esforç considerable en aïllar membres del grup *Roseobacter* de diverses mostres d'origen marí, ara com els ports esportius de l'Illa de Mallorca i les platges contaminades per petroli del litoral gallec. L'interès de Micro-UIB pel grup *Roseobacter* ve donat perquè els Roseobacters són components claus del bacteriplàncton marí, especialment a aigües costaneres, on poden arribar a suposar més del 20% dels procariotes que contenen (Buchan *et al.*, 2005). Com passa amb *Pseudomonas*, els Roseobacters tenen un estil de vida generalista i són metabòlicament molt versàtils. Addicionalment, són capaços d'emprar hidrocarburs aromàtics per a créixer (Buchan i González, 2010). L'anàlisi genòmic dels Roseobacters ha revelat que poden codificar fins a sis vies catabòliques per hidrocarburs monoaromàtics:

benzoat, gentisat, homoprotocatecuat, fenilacetat, homogentisat i protocatecuat (Moran *et al.*, 2007; Newton *et al.*, 2010). Els nostres esforços han permès l'aïllament en cultiu pur de diversos Roseobacters filogenèticament distints. Malgrat l'aïllament es va fer en absència d'hidrocarburs, 19 d'ells són capaços d'emprar almenys un hidrocarbur aromàtic com a font única de carboni i energia (Piña-Villalonga, 2012; Suárez-Suárez, 2013), suggerint que els Roseobacters participarien en la degradació d'hidrocarburs aromàtics a l'ecosistema marí. L'aïllat de *Roseobacter* que hem caracteritzat fins a la data d'avui, *Citreicella aestuarii* 357, és capaç de degradar naftalè i dibenzotiofè. El seu genoma ha estat recentment seqüenciat (Suárez-Suárez *et al.*, 2012). La via de degradació de naftalè i dibenzotiofè de la soca 357 ha estat caracteritzada, tant genètica com bioquímicament (Suárez-Suárez, 2013). Hem pogut demostrar que la soca 357 catabolitza naftalè *via* salicilat i gentisat (Fig. 1). Fins a la data d'avui, aquest és el primer document científic sobre una via de degradació d'hidrocarburs poliaromàtics ben caracteritzada a un membre del grup *Roseobacter*.

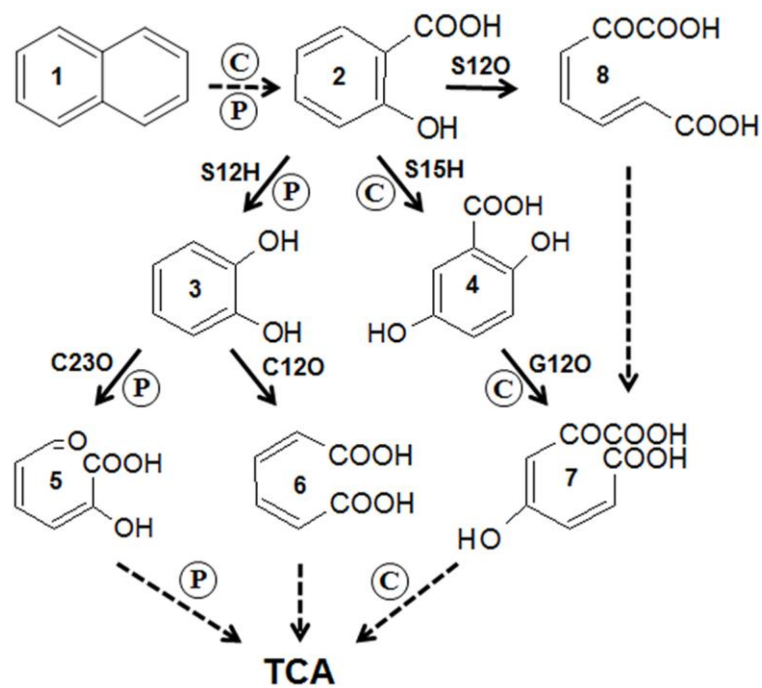


Fig. 1. Vies de degradació aeròbica de naftalè a bacteris. P i C indiquen el camí realitzat pel naftalè en la seva metabolització a *Pseudomonas stutzeri* AN10 i *Citreicella aestuarii* 357, respectivament. Enzims: S12H, salicilat 1,2-hidroxilasa; C23O, catecol 2,3-dioxigenasa; C12O, catecol 1,2-dioxigenasa; S15H, salicilat 1,5-hidroxilasa; G12O, gentisat 1,2-dioxigenasa; S12O, salicilat 1,2-dioxigenasa. Les línies discontinues indiquen transformacions bioquímiques catalitzades per més d'1 enzim. Metabòlits: 1, naftalè; 2, salicilat; 3, catecol; 4, gentisat; 5, hidroximucònic semialdehid; 6, cis-cis-hidroximuconat; 7, 3-maleilpiruvat; 7, 2-oxohepta-3,5-dienedioiat. TCA: Cicle d'un dels àcids tri-carboxílics.

La majoria invisible: una aproximació molecular a l'ecologia microbiana

Tal com s'ha esmentat abans, menys de l'1% dels bacteris detectats per microscòpia a les mostres ambientals poden formar colònies als medis sòlids. Per aquest motiu, i durant els darrers 30 anys, el coneixement sobre els bacteris ambientals s'ha obtingut principalment mitjançant aproximacions independents de cultiu basades en tècniques de biologia molecular. Aquestes aproximacions s'han emprat també al grup de recerca Micro-UIB per a explorar la majoria no cultivable dels hàbitats d'origen dels nostres aïllats degradadors d'hidrocarburs. Un exemple és l'estudi amb tècniques dependents i independents de cultiu de les poblacions de *Pseudomonas* realitzat al litoral gallec després del vessament de petroli del Prestige. L'objectiu del treball era investigar el paper dels membres del gènere *Pseudomonas* en els processos de degradació naturals de la zona intermareal (Mulet *et al.*, 2011). Amb aquest treball es va posar a punt un mètode d'identificació de *Pseudomonas* a mostres ambientals basat en l'amplificació per PCR (Reacció en Cadena de la Polimerasa) del gen *rpoD* (Mulet *et al.*, 2009). Com a resultat més rellevant, es va detectar i caracteritzar una nova espècie de *Pseudomonas*, *P. aestusnigri* (Sánchez *et al.*, 2014).

L'ecosistema marí contaminat per hidrocarburs més ben caracteritzat pel nostre grup és l'aigua costanera dels ports esportius de l'Illa de Mallorca, principalment per l'esforç de mostreig realitzat per tres dels nostres estudiants durant la realització de les seves tesis doctorals (Aguiló-Ferretjans, 2009; Lanfranconi, 2010; Piña-Villalonga, 2012). El major esforç de mostreig es va realitzar a Port Adriano (Calvià, Mallorca). Així, i durant un període de dos anys, vàrem realitzar un mostreig mensual a 18 estacions localitzades dintre i al voltant de dit port esportiu. La combinació de tècniques en biologia molecular i SIG (Sistemes d'Informació Geogràfica) mostrà la substitució gradual de les poblacions bacterianes majoritàries a aigües prístines (p.e., SAR11) per diferents poblacions del grup *Roseobacter* (Fig. 2), i per membres dels *phyla Gammaproteobacteria* i *Bacteroidetes* (Nogales *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008). Per aclarir si aquests canvis poblacionals eren conseqüència de la presència d'hidrocarburs, vàrem realitzar experiments en microcosmos amb aigües prístines contaminades artificialment amb dièsel. El nostre objectiu era simular els successos típics de contaminació per hidrocarburs que ocorren de manera crònica als ports esportius i aigües costaneres del seu voltant. Tal com s'esperava, els filotips relacionats amb les poblacions típiques d'aigües prístines (SAR11, SAR86 i picocianobacteris) varen veure reduït el seu nombre mentre que filotips del grup *Roseobacter* es varen veure afavorits (Lanfranconi *et al.*, 2010). Aquests resultats indicaven que la contaminació per hidrocarburs podria ésser la responsable dels canvis poblacionals prèviament observats a la transició entre aigües prístines i àrees portuàries contaminades, i presentaven als Roseobacters com a actors principals en el catabolisme dels hidrocarburs a les aigües marines costaneres.

Aproximacions actuals i futures: les tecnologies "òmiques"

A l'actualitat, la comunitat científica està fent un esforç enorme en la seqüenciació de genomes sencers d'aïllats ambientals -genòmica (Loman *et al.*, 2012)- per a investigar la rellevància ecològica i biotecnològica de la gran diversitat de bacteris cultivables. De fet,

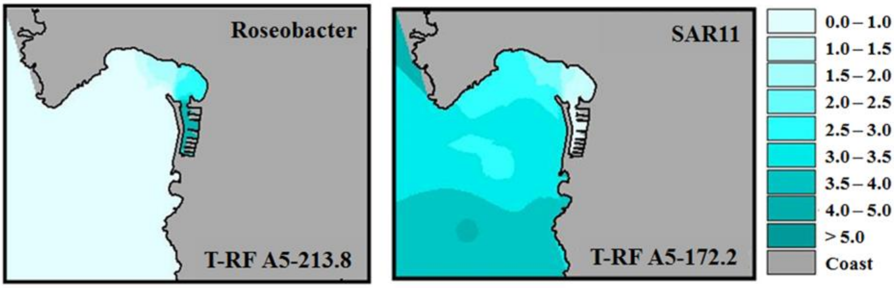


Fig. 2. Mapa mostrant la variació geogràfica (abundància relativa) de dues poblacions de SAR11 i *Roseobacter* a aigües superficials pròximes a Port Adriano (Calvià, Mallorca).

l'aproximació genòmica s'ha estès a l'anàlisi de les comunitats bacterianes -metagenòmica (Danhorn *et al.*, 2012)- i a l'estudi de les cèl·lules individuals no cultivables -genòmica de cèl·lules individuals (Yilmaz i Singh, 2012)-, evitant les etapes d'aïllament de microorganismes. Així, una gran quantitat d'informació genètica s'ha introduït a les bases de dades públiques. Aquestes dades han permès el desenvolupament de diverses metodologies d'alt rendiment dirigides a avaluar quins gens s'expressen -transcriptòmica (Cloots i Marchal, 2011)- i quines proteïnes es produeixen -proteòmica (Armengaud, 2013)-. Addicionalment, s'han desenvolupat metodologies d'alt rendiment per a identificar els metabòlits cel·lulars -metabolòmica (Putri *et al.*, 2013)-. El pas final de les tecnologies "òmiques" és la fluxòmica (Winter i Krömer, 2013), que intenta establir les relacions entre totes les dades "òmiques" per a explicar el flux de metabòlits dintre i entre les cèl·lules.

Els investigadors del grup Micro-UIB han començat a treballar amb dites tecnologies. Així, i tal com s'ha comentat abans, hem seqüenciat el genoma de *C. aestuarii* 357 (Suárez-Suárez *et al.*, 2012). A més a més, hem finalitzat la seqüenciació dels genomes de cinc soques de *P. stutzeri*, tres d'elles no degradadores -ZoBell (Peña *et al.*, 2012), JM300 (Busquets *et al.*, 2012) i NF13 (Peña *et al.*, 2013)- i dues d'elles degradadores de naftalè-CCUG 29243 (Brunet-Galmés *et al.*, 2012) i B1SMN1 (Busquets *et al.*, 2013)-. Actualment, estam seqüenciant els genomes d'altres 20 aïllats (11 *Pseudomonas* i 9 Roseobacters), la mitat d'ells capaços de catabolitzar un o més hidrocarburs. També ens hem involucrat en proteòmica, estudiant els patrons d'expressió proteica de diferents Roseobacters d'origen marí en distintes condicions d'interès ambiental (Christie-Oleza *et al.*, 2012a; 2012b). En un futur proper, els nostres objectius de recerca es centraran en, combinant diferents tècniques "òmiques" (p.e. genòmica, metagenòmica i proteòmica), millorar el coneixement de la biologia de la degradació d'hidrocarburs en els nostres dos models bacterians: *Pseudomonas* i Roseobacters.

Agraïments

I.B.-G., M.M.-Ll i C.M.A.-M són receptores de beques predoctorals del Govern de les Illes Balears (amb cofinançament del Fons Social Europeu), del programa FPU del MECD i del programa FPI del MINECO, respectivament. M.G. és receptora d'un contracte

postdoctoral de la Universitat de les Illes Balears, amb finançament del MECD (Programa Campus d'Excel·lència Internacional). Els fons per la recerca provenen dels projectes CSD2009-00006, CGL2011-24318, CTM2011-24886 i CGL2012-36604, així com de fons pels grups de recerca competitius del Govern de les Illes Balears (tots ells amb cofinançament FEDER).

Aerobic aromatic hydrocarbon degradation by *Pseudomonas* and Roseobacters

Since the mid-eighties of the past century, the Microbiology Research Group at the University of Balearic Islands (Micro-UIB) has been working in Environmental Microbiology. As described in the research group institutional web-page (http://www.uib.eu/en/research/groups/grup/MICROBIO/), its research has been focused in three major lines: "Evaluation of concepts and definition of bacterial taxa", "Analysis of microbial communities and ecologically relevant organisms", and "Microbiology of environmental pollution". Thus, Micro-UIB researchers have explored the bacterial diversity, in terms of taxonomy and physiology, of several environmental ecosystems from more than 20 geographical locations. Their contribution in bacterial taxonomy has result in the description of nearly 50 new bacterial species. They have also explored the physiology of cultured bacteria using biochemical and genetic approaches. Furthermore, they have started to apply new technologies (genomics and proteomics) in the study of their model bacteria. Present report summarizes the scientific contributions of the Micro-UIB group in the field of aerobic degradation of aromatic hydrocarbons by members of the *Pseudomonas* genus and the *Roseobacter* clade, and describes their challenges for the next decade in this scientific research field.

The cultivable minority: *Pseudomonas* genus and *Roseobacter* clade

Environmental microbiology can be defined as the study of microorganisms in the environment, analyzing which microorganisms are there, which is the size of their populations, and which is their role in the environment. The classic approach for answering these questions has been the isolation of microorganisms in pure culture and its further taxonomical, physiological, and genetic characterization. However, it has been postulated that we are able to cultivate just a small fraction (less than 1% on average) of the entire community (Stewart, 2012). Following this strategy, the first scientific reports from Micro-UIB were centered in the isolation and identification of hydrocarbon-degrading bacteria which play a key role in the biodegradation of pollutants. The cultivation strategy used (enrichment and growth with hydrocarbons as unique energy and carbon source) has

resulted in a wide collection of isolates, most of them affiliated to the genus *Pseudomonas*, which were able to catabolize hydrocarbons (Ferrer *et al.*, 1986; García-Valdés *et al.*, 1988; Rosselló-Mora *et al.*, 1994b; Mulet *et al.*, 2011). Members of the genus *Pseudomonas* are generalist bacteria harboring versatile metabolic capabilities that confer them a wide potential for adaptation to fluctuating environmental conditions (Silby *et al.*, 2011). As evolutionary consequence, a wide diversity in term of bacterial species has been described within the genus (Mulet *et al.*, 2010; Palleroni and Moore, 2004). Up to date, *Pseudomonas* is the genus of Gram negative bacteria with the highest number of validly described species (140 species in February 2014) according to the Euzeby's List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (http://www.bacterio.net/pseudomonas.html).

Interestingly, most of the isolates analyzed by the Micro-UIB researchers affiliated to the species *Pseudomonas stutzeri* (García-Valdés *et al.*, 1988; Rosselló-Mora *et al.*, 1994b). As consequence, a big effort in clarifying the taxonomy of these isolates was performed using most of available techniques used in bacterial taxonomy: DNA-DNA hybridization (Rosselló *et al.*, 1991), serology (Rosselló *et al.*, 1992), biochemical and chemotaxonomic analysis (Rosselló-Mora *et al.*, 1994a), 16S rRNA-based phylogeny (Bennasar *et al.*, 1996), Pulsed Field Gel Electrophoresis analysis (Ginard *et al.*, 1997), rRNA spacer analysis (Guasp *et al.*, 2000), Multi Locus Enzyme Electrophoresis Analysis (Rius *et al.*, 2001), Multi Locus DNA Sequence Analysis (Cladera *et al.*, 2004), siderotyping (Mulet *et al.*, 2008), and whole-cell Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight mass spectrometry (Scotta *et al.*, 2013). Thus, isolates obtained by Micro-UIB have been finally grouped in 22 different genomovars -groups of strains which are genomically and phylogenetically differentiable, but phenotypically indistinguishable (Ursing *et al.*, 1995)- within the species *P. stutzeri* (Rosselló *et al.*, 1991; Rosselló-Mora *et al.*, 1996; Guasp *et al.*, 2000; Sepúlveda-Torres *et al.*, 2001; García-Valdés *et al.*, 2003; Sikorski *et al.*, 2005; Mulet *et al.*, 2008; Scotta *et al.*, 2013) and a new species has been described: *Pseudomonas balearica* (Bennasar *et al.*, 1996).

In relation to aromatic hydrocarbon catabolic potential of hydrocarbon degraders, scientific community has reported the isolation of *P. stutzeri* strains able to metabolize benzoate (and halogenated derivatives), 4-hydroxybenzoate, benzenesulfonate (and methyl derivatives), carbazole, cresol, dibenzothiophene, fluoranthene, fluorine, indane, naphthalene (and methyl or chloro derivatives), PCBs, phenanthrene, phenol (and methyl derivatives), pyrene, quinoline, salicylate (and methyl and chloro derivatives), tetralin, toluate, toluene, and xylene (Lalucat *et al.*, 2006 and references therein). In this field, Micro-UIB researchers reported the isolation of *P. stutzeri* strains able to use benzoate, chloronaphthalene, chlorosalicylate, methylnaphthalene, methylsalicylate, naphthalene, salicylate, toluate, and/or xylene as unique carbon and energy source (García-Valdés *et al.*, 1988; 2003; Rosselló-Mora *et al.*, 1994b). From them, the strain most exhaustively studied by the Micro-UIB group has been *P. stutzeri* AN10, whose entire naphthalene degradation pathway has been well characterized (Fig. 1). Genes coding for the enzymes of this pathway are structured in four operons: *nahAaAbAcAdBFCED*, coding for the enzymes involved in the conversion of naphthalene to salicylate (Amengual, 1992; Bosch *et al.*, 1999a); *nahGTHINLOMKJ*, coding for the conversion of salicylate to catechol (mediated by the NahG salicylate 1-hydroxylase) and its further *meta*-cleavage by a catechol 2,3-dioxygenase (NahH) that channels it to the tricarboxylic acid cycle (Bosch *et al.*, 2000);

nahW, coding for the additional salicylate 1-hydroxylase (Bosch *et al.*, 1999b) that effectively convert the salicylate produced during naphthalene degradation to catechol, preventing its toxic effect (Lanfranconi *et al.*, 2009); and the last containing the regulatory gene *nahR* (Bosch *et al.*, 2000), responsible of the transcriptional activation of the catabolic operons in the presence of salicylate. Interestingly, several Insertion Sequences (ISs) - autonomous mobile genetic elements commonly found in bacteria (for information, visit IS-Finder web site at https://www-is.biotoul.fr/)- were found beside the catabolic genetic pathways. One of them, IS*Pst9*, resulted to be essential in the acquisition of the capability to degrade chlorosalicylates by *P. stutzeri* AN10 (Ginard, 1997; Christie-Oleza *et al.*, 2008) due to a gene inactivation event that allowed the proper degradation of chlorocatechol. This experimental evidence suggested a relevant role for those ISs in the adaptation of *P. stutzeri* AN10 to the presence of hydrocarbons. Thus, long-term evolutionary experiments with strain AN10 and salicylate as hydrocarbon model were started. The results of these experiments demonstrated that the mobilization of ISs causes gene inactivation and genome reorganization events that seem to be essential for the adaptation of strain AN10 to grow at high salicylate concentrations (up to 36 mM) (Martín-Cardona, 2009).

During the last decade Micro-UIB researchers have also done an effort to isolate members of the *Roseobacter* clade from diverse marine samples, such as marinas of Mallorca Island and oil-polluted beaches at the Galician coast. The interest of the Micro-UIB group in the *Roseobacter* clade started because they are key components of marine bacterioplankton, particularly in coastal surface water where they can represent more than 20% of total prokaryotes (Buchan *et al.*, 2005). As *Pseudomonas*, Roseobacters have a generalist lifestyle and are metabolically versatile. In addition, they are able to use aromatic hydrocarbons for growth. (Buchan and González, 2010). Genome analysis of Roseobacters has revealed that they can harbor up to six catabolic pathways for monoaromatic hydrocarbons: benzoate, gentisate, homoprotocatechuate, phenylacetate, homogentisate, and protocatechuate (Moran *et al.*, 2007; Newton *et al.*, 2010). Our isolation efforts resulted in the cultivation in pure culture of several phylogenetically distinct Roseobacters. Although isolation was performed in the absence of hydrocarbons, 19 of them were able to use at least one aromatic hydrocarbon as unique carbon and energy source (Piña-Villalonga, 2012; Suárez-Suárez, 2013), suggesting that Roseobacters might participate in aromatic hydrocarbon degradation in marine environments. The *Roseobacter* isolate physiologically characterized up to date, *Citreicella aestuarii* strain 357, is able to degrade naphthalene and dibenzothiophene. The genome of this isolate has been recently sequenced (Suárez-Suárez *et al.*, 2012). The pathway for the degradation of naphthalene and dibenzothiophene in strain 357 has been genetically and biochemically characterized (Suárez-Suárez, 2013). We have demonstrated that strain 357 catabolizes naphthalene *via* salicylate and gentisate (Fig. 1). Up to date, this is the first report of a well characterized polyaromatic hydrocarbon degradative pathway in a member of the *Roseobacter* clade.

The unseen majority: a molecular microbial ecology approach

As mentioned before, less than a 1% of the bacteria detected by microscopy in environmental samples are able to form colonies on solid media. For this reason, and during

the last 30 years, knowledge about environmental bacteria has been mainly gained by culture-independent approaches based on molecular biology techniques. These approaches have been also applied by Micro-UIB researchers to explore the unseen majority in the original habitats from which our hydrocarbon-degrading strains were isolated. As example, a combined study of the *Pseudomonas* populations by culture-dependent and -independent study was performed at the Galicia coast after the Prestige oil spill to assess the role of this bacterial genus in the natural attenuation of the oil pollution in the intertidal zone (Mulet *et al.*, 2011). Therefore, a new PCR method based on the *rpoD* gene sequence was developed for detecting *Pseudomonas* in environmental samples (Mulet *et al.*, 2009). As major result, a new *Pseudomonas* species (*P. aestusnigri*) was detected and characterized (Sanchez *et al.*, 2014).

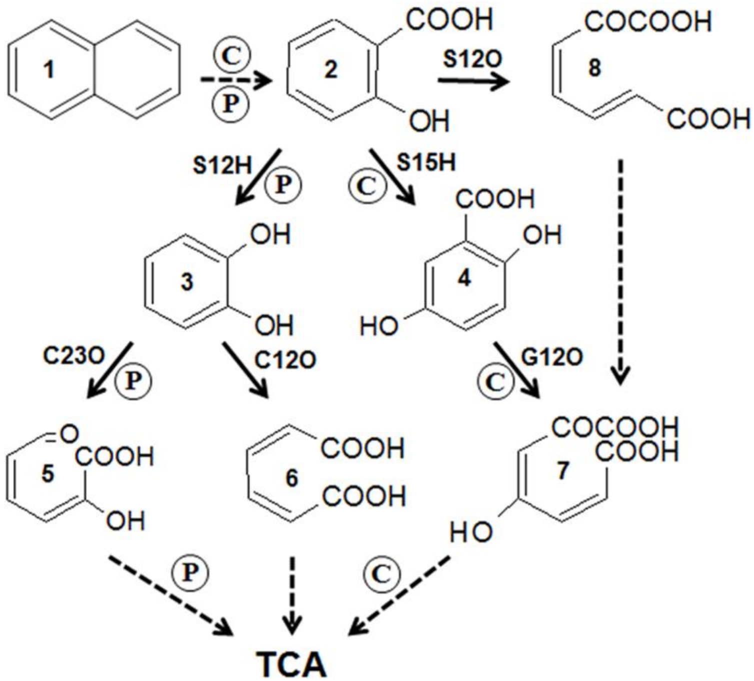


Fig. 1. Aerobic naphthalene degradation pathways in Bacteria. P and C indicates de pathway followed by naphthalene in *Pseudomonas stutzeri* AN10 and *Citreicella aestuarii* 357, respectively. Enzymes: S12H, salicylate 1,2-hydroxylase; C23O, catechol 2,3-dioxygenase; C12O, catechol 1,2-dioxygenase; S15H, salicylate 1,5-hydroxylase; G12O, gentisate 1,2-dioxygenase; S12O, salicylate 1,2 dioxygenase. Dashed lines indicate biochemical transformations catalyzed by more than one enzyme. Compounds: 1, naphthalene; 2, salicylate; 3, catechol; 4, gentisate; 5, hydroxymuconic semialdehyde; 6, cis-cis-hydroxymuconate; 7, 3-maleylpyruvate; 7, 2-oxohepta-3,5-dienedioiate. TCA: tricarboxylic acid cycle.

Anyhow, the best characterized hydrocarbon-polluted marine ecosystem has been the coastal waters of marinas from Mallorca Island due to the sampling effort performed by three of our students during their Doctoral Thesis (Aguiló-Ferretjans, 2009; Lanfranconi, 2010; Piña-Villalonga, 2012). Biggest effort was done in Port Adriano marina (Calvià, Mallorca, Spain). Thus, for a period of two years, we performed monthly samplings in 18 different stations located in this marina and its nearby coastal waters. Combination of molecular biology techniques and GIS (Geographic Information Systems) technology showed a gradual substitution of the major bacterial populations (i.e. SAR11) in pristine-water by different populations of the *Roseobacter* clade (Fig. 2), and by members of the *Gammaproteobacteria* and *Bacteroidetes* phyla (Nogales *et al.*, 2007; Aguiló-Ferretjans *et al.*, 2008). In order to clarify if those population changes were due to the presence of hydrocarbons, we planned microcosms experiments with pristine water that were polluted with diesel. Our aim was to simulate the typical hydrocarbon pollution events that happen in marinas and their nearby coastal waters. As expected, the phylotypes related to pristine-water populations (SAR11, SAR86, and picocyanobacteria) were reduced in number while phylotypes of the *Roseobacter* clade were favored (Lanfranconi *et al.*, 2010). These results indicated that hydrocarbon pollution might be responsible of the population changes previously observed in the transition between pristine and polluted marina areas, and suggest Roseobacters to be major actors in the catabolism of hydrocarbons in coastal marine waters.

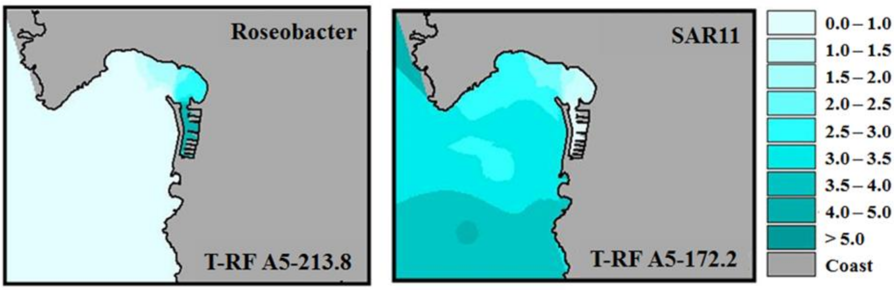


Fig. 2. Map showing the geographical variation (relative abundance) of two populations of SAR11 and Rosebacter in surface seawater next to Puerto Adriano (Calvià, Mallorca, Spain).

Current and future approaches: The "omics" technologies.

Currently, the scientific community is doing a big effort in sequencing whole genomes of environmental isolates -genomics (Loman *et al.*, 2012)- in order to investigate the ecological and biotechnological relevance of the wide diversity of culturable bacteria. In fact, the genomic approach has been extended to entire bacterial communities -metagenomics (Danhorn *et al.*, 2012)- and to uncultivated single cells -single cell genomics (Yilmaz and Singh, 2012)-, avoiding the isolation procedure. Thus, a huge amount of genetic data has been deposited in public databases. This data has allowed the development of diverse high-throughput methods to evaluate which genes are expressed -transcriptomics

(Cloots and Marchal, 2011)-, and which proteins are produced -proteomics (Armengaud, 2013)-. Additionally, high-throughput methods to identify cell metabolites have also been developed -metabolomics (Putri *et al.*, 2013)-. The final step in this "omics" technologies is fluxomics (Winter and Krömer, 2013), which tries to establish relations between all "omics" data in order to explain the flux of metabolites in cell.

Micro-UIB researchers have started to work with "omics" technologies. As previously mentioned, we have sequenced the genome of *C. aestuarii* 357 (Suárez-Suárez *et al.*, 2012). Additionally, we have finished the genome sequence of five *P. stutzeri* strains, three unable -ZoBell (Peña *et al.*, 2012), JM300 (Busquets *et al.*, 2012), and NF13 (Peña *et al.*, 2013)- and two able to catabolize naphthalene -CCUG 29243 (Brunet-Galmés *et al.*, 2012) and B1SMN1 (Busquets *et al.*, 2013)-. Currently, we are sequencing genomes of other twenty isolates (11 *Pseudomonas* and 9 Roseobacters), half of them able to catabolize one or more hydrocarbons. We have also been involved in proteomics, studying protein expression patterns of several marine Roseobacters in different environmentally relevant conditions (Christie-Oleza *et al.*, 2012a; 2012b). Our near-future research aim is, combining several "omics" technologies (i.e. genomic, metagenomic, and proteomics), to improve our knowledge in the biology of hydrocarbon degradation in our two model microorganisms: *Pseudomonas* and Roseobacters.

Acknowledgements

I.B.-G., M.M.-Ll, and C.M.A.-M were supported by a fellowship from the Government of the Balearic Islands (with FSE co-funding), a FPU grant from the Spanish MECD, and a FPI grant from the Spanish MINECO, respectively. M.G. was supported by a postdoctoral contract from the University of the Balearic Islands, with funds from the Spanish MECD through the International Excellence Campus Program. Funds were obtained from projects CSD2009-00006, CGL2011-24318, CTM2011-24886, and CGL2012-36604, as well as funds for competitive research groups from the Government of the Balearic Islands (all with FEDER co-funding).

References

Aguiló-Ferretjans, M.M., Bosch, R., Martín-Cardona, C., Lalucat, J. and Nogales, B. 2008. Phylogenetic analysis of the composition of bacterial communities in human-exploited coastal environments from Mallorca Island (Spain). *Syst. Appl. Microbiol.* 31: 231-240.

Aguiló-Ferretjans, M.M. 2009. *Dinàmica espai-temporal de comunitats bacterianes marines en relació a l'ús del litoral a l'illa de Mallorca*. Doctoral Thesis. Universitat de les Illes Balears.

Amengual, J.F. 1992. *Metabolismo de derivados halogenados y metilados del naftaleno por Pseudomonas stutzeri AN10.* Doctoral Thesis. Universitat de les Illes Balears.

Armengaud, J. 2013. Microbiology and proteomics, getting the best of both worlds! *Environ. Microbiol.* 15: 12-23.

Bennasar, A., Rosselló-Mora, R., Lalucat, J. and Moore, E.R.B. 1996. 16S rRNA gene sequence analysis relative to genomovars of *Pseudomonas stutzeri* and proposal of *Pseudomonas balearica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 200-205.

Bosch, R., García-Valdés, E. and Moore, E.R. 1999a. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene* 236: 149-157.

Bosch, R., Moore, E.R., García-Valdés, E. and Pieper, D.H. 1999b. NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *J. Bacteriol.* 181: 2315-2322.

Bosch, R., García-Valdés, E. and Moore, E.R.B. 2000. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene* 245: 65-74.

Buchan, A., González, J.M. and Moran, M.A. 2005. Overview of the marine *Roseobacter* lineage. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5665-5677.

Buchan, A. and González, J.M. 2010. *Roseobacter*. *In:* Timmis, K.N. (ed.) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer-Verlag, Berlin. 1335-1343.

Busquets, A., Peña, A., Gomila, M., Bosch, R., Nogales, B., García-Valdés, E., Lalucat, J. and Bennasar, A. 2012. Genome sequence of *Pseudomonas stutzeri* strain JM300 (DSM 10701), a soil isolate and model organism for natural transformation. *J. Bacteriol.* 194: 5477-5478.

Busquets, A., Peña, A., Gomila, M., Mayol, J., Bosch, R., Nogales, B., García-Valdés, E., Bennasar, A. and Lalucat, J. 2013. Draft genome sequence of *Pseudomonas stutzeri* strain B1SMN1, a nitrogen-fixing and naphthalene-degrading strain isolated from wastewater. *Genome Announc.* 1: e00584-13.

Brunet-Galmés, I., Busquets, A., Peña, A., Gomila, M., Nogales, B., García-Valdés, E., Lalucat, J., Bennasar, A. and Bosch, R. 2012. Complete genome sequence of the naphthalene-degrading bacterium *Pseudomonas stutzeri* AN10 (CCUG 29243). *J. Bacteriol.* 194: 6642-6643.

Christie-Oleza, J.A., Nogales, B., Martín-Cardona, C., Lanfranconi, M.P., Albertí, S., Lalucat, J. and Bosch, R. 2008. IS*Pst9*, an IS*L3*-like insertion sequence from *Pseudomonas stutzeri* AN10 involved in catabolic gene inactivation. *Int. Microbiol.* 11: 101-10.

Christie-Oleza, J.A., Fernandez, B., Nogales, B., Bosch, R. and Armengaud, J. 2012a. Proteomic insights into the lifestyle of an environmentally relevant marine bacterium. *ISME J.* 6: 124-135.

Christie-Oleza, J.A., Piña-Villalonga, J.M., Bosch, R., Nogales, B. and Armengaud, J. 2012b. Comparative proteogenomics of twelve Roseobacter exoproteomes reveals different adaptive strategies among these marine bacteria. *Mol. Cell. Proteomics* 11: M111.013110.

Cladera, A.M., Bennasar, A., Barceló, M., Lalucat, J. and García-Valdés, E. 2004. Comparative genetic diversity of *Pseudomonas stutzeri* genomovars, clonal structure, and phylogeny of the species. *J. Bacteriol.* 186: 5239-5248.

Cloots, L. and Marchal, K. 2011. Network-based functional modeling of genomics, transcriptomics and metabolism in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 14: 599-607.

Danhorn, T., Young, C.R. and DeLong E.F. 2012. Comparison of large-insert, small-insert and pyrosequencing libraries for metagenomic analysis. *ISME J.* 6: 2056-2066.

Ferrer, C., Cózar, E., García-Valdés, E. and Rotger, R. 1986. IncP-7 naphthalene-degradative plasmids from *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Lett.* 36: 21-25.

García-Valdés, E., Cozar, E., Rotger, R., Lalucat, J. and Ursing, J. 1988. New naphthalene-degrading marine *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2478-2485.

García-Valdés, E., Castillo, M.M., Bennasar, A., Guasp, C., Cladera, A.M., Bosch, R., Engesser, K.H. and Lalucat, J. 2003. Polyphasic characterization of *Pseudomonas stutzeri* CLN100 which simultaneously degrades chloro- and methylaromatics: a new genomovar within the species. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 390-403.

Ginard, M. 1997. *Organización genómica de Pseudomonas stutzeri y sus implicaciones taxonómicas y evolutivas.* Doctoral Thesis. Universitat de les Illes Balears.

Ginard, M., Lalucat, J., Tümmler, B. and Römling, U. 1997. Genome organization of *Pseudomonas stutzeri* and resulting taxonomic and evolutionary considerations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 132-143.

Guasp, C., Moore, E.R., Lalucat, J. and Bennasar, A. 2000. Utility of internally transcribed 16S-23S rDNA spacer regions for the definition of *Pseudomonas stutzeri* genomovars and other *Pseudomonas* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1629-1639.

Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E. and Palleroni, N.J. 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 510-547.

Lanfranconi, M.P., Christie-Oleza, J.A., Martín-Cardona, C., Suárez-Suárez, L.Y., Lalucat, J., Nogales, B. and Bosch, R. 2009. Physiological role of NahW, the additional salicylate hydroxylase found in *Pseudomonas stutzeri* AN10. *FEMS Microbiol. Lett.* 300: 265-272.

Lanfranconi, M.P. 2010. *Functional response of marine microbial communities to diesel pollution.* Doctoral Thesis. Univesitat de les Illes Balears.

Lanfranconi, M.P., Bosch, R. and Nogales, B. 2010. Short-term changes in the composition of active marine bacterial assemblages in response to diesel oil pollution. *Microb. Biotechnol.* 3: 607-621.

Loman, N.J., Constantinidou, C., Chan, J.Z., Halachev, M., Sergeant, M., Penn, C.W., Robinson, E.R. and Pallen, M.J. 2012. High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 599-606.

Martín-Cardona, C. 2009. *Versatilidad genético-fisiológica en poblaciones de Pseudomonas stutzeri AN10 sometidas a estrés químico por salicilato*. Doctoral Thesis. Universitat de les Illes Balears.

Moran, M.A., Belas, R., Schell, M.A., González, J.M., Sun, F., Sun, S., Binderl, B.J., Edmonds, J., Ye, W., Orcutt, B., Howard, E.C., Meile, C., Palefsky, W., Goesmann, A., Ren, Q., Paulsen, I., Ulrich, L.E., Thompson, L.S., Saunders, E. and Buchan, A. 2007. Ecological genomics of marine roseobacters. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4559-4569.

Mulet, M., Gomila, M., Gruffaz, C., Meyer, J.M., Palleroni, N.J., Lalucat, J. and García-Valdés, E. 2008. Phylogenetic analysis and siderotyping as useful tools in the taxonomy of *Pseudomonas stutzeri*: description of a novel genomovar. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 58: 2309-2315.

Mulet, M., Bennasar, A., Lalucat, J. and García-Valdés, E. 2009. An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Mol. Cell. Probes*. 23: 140-147.

Mulet, M., Lalucat, J. and García-Valdés, E. 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 12: 1513-1530.

Mulet, M., David, Z., Nogales, B., Bosch, R., Lalucat, J. and García-Valdés, E. 2011. *Pseudomonas* diversity in crude-oil-contaminated intertidal sand samples obtained after the Prestige oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 1076-1085.

Newton, R.J., Griffin, L.E., Bowles, K.M., Meile, C., Gifford, S., Givens, C.E., Howard, E.C., King, E., Oakley, C.A., Reisch, C.R., Rinta-Kanto, J.M., Sharma, S., Sun, S., Varaljay, V., Vila-Costa, M., Westrich, J.R. and Moran, M.A. 2010. Genome characteristics of a generalist marine bacterial linage. *ISME J.* 4: 784-798.

Nogales, B., Aguiló-Ferretjans, M.M., Martín-Cardona, C., Lalucat, J. and Bosch, R. 2007. Bacterial diversity, composition and dynamics in and around recreational coastal areas. *Environ. Microbiol*. 9: 1913-1929.

Palleroni, N.J. and Moore, E.R.B. 2004. *Taxonomy of pseudomonads: experimental approaches. In:* Ramos, J.L. (ed.) *Pseudomonas I. Genomics, Life Style and Molecular Architecture.* Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY. 3-44.

Peña, A., Busquets, A., Gomila, M., Bosch, R., Nogales, B., García-Valdés, E., Lalucat, J. and Bennasar, A. 2012. Draft genome of *Pseudomonas stutzeri* strain ZoBell (CCUG 16156), a marine isolate and model organism for denitrification studies. *J. Bacteriol.* 194: 1277-1278.

Peña, A., Busquets, A., Gomila, M., Mayol, J., Bosch, R., Nogales, B., García-Valdés, E., Bennasar, A. and Lalucat, J. 2013. Draft genome of *Pseudomonas stutzeri* Strain NF13, a nitrogen fixer isolated from the Galapagos Rift hydrothermal vent. *Genome Announc.* 1: e00113-13.

Piña-Villalonga, J.M. 2012. *Diversidad e importancia ecológica del grupo Roseobacter en aguas costeras sometidas a impacto antropogénico.* Doctoral Thesis. Universitat de les Illes Balears.

Putri, S.P., Nakayama, Y., Matsuda, F., Uchikata, T., Kobayashi, S., Matsubara, A. and Fukusaki, E. 2013. Current metabolomics: practical applications. *J. Biosci. Bioeng.* 115: 579-589.

Rius, N., Fusté, M.C., Guasp, C., Lalucat, J. and Lorén, J.G. 2001. Clonal population structure of *Pseudomonas stutzeri*, a species with exceptional genetic diversity. *J. Bacteriol.* 183: 736-744.

Rosselló, R., García-Valdés, E., Lalucat, J. and Ursing, J. 1991. Genotypic and phenotypic diversity of *Pseudomonas stutzeri*. *Syst. Appl. Microbiol.* 14: 150-157.

Rosselló, R., García-Valdés, E., Macario, A.J.L., Lalucat, J. and Conway de Macario, E. 1992. Antigenic diversity of *Pseudomonas stutzeri*. *System. Appl. Microbiol.* 15: 617-623.

Rosselló-Mora, R.A., Lalucat, J., Dott, W. and Kämpfer, P. 1994a. Biochemical and chemotaxonomic characterization of *Pseudomonas stutzeri* genomovars. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 226-233.

Rosselló-Mora, R.A., Lalucat, J. and García-Valdés, E. 1994b. Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 966-972.

Rosselló-Mora, R.A., Lalucat, J. and Moore, E.R.B. 1996. Strain JM300 represents a new genomovar within *Pseudomonas stutzeri*. *System. Appl. Microbiol.* 19: 596-599.

Sánchez, D., Mulet, M., Rodríguez, A.C., David, Z., Lalucat, J. and García-Valdés, E. 2014. *Pseudomonas aestusnigri* sp. nov., isolated from crude oil-contaminated intertidal sand samples after the Prestige oil spill. *Syst. Appl. Microbiol.* 37: 89-94.

Scotta, C., Gomila, M., Mulet, M., Lalucat, J. and García-Valdés, E. 2013. Whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry and multilocus sequence analysis in the discrimination of *Pseudomonas stutzeri* populations: three novel genomovars. *Microb. Ecol.* 66: 522-532.

Sepúlveda-Torres, L.C., Zhou, J., Guasp, C., Lalucat, J., Knaebel, D., Plank, J.L. and Criddle, C.S. 2001. *Pseudomonas* sp. strain KC represents a new genomovar within *Pseudomonas stutzeri*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 2013-2019.

Sikorski, J., Lalucat, J. and Wackernagel, W. 2005. Genomovars 11 to 18 of *Pseudomonas stutzeri*, identified among isolates from soil and marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1767-1770.

Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., Levy, S.B. and Jackson, R.W. 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* 35: 652-680.

Stewart, E.J. 2012. Growing unculturable bacteria. *J. Bacteriol.* 194: 4151-4160.

Suárez-Suárez, L.Y., Brunet-Galmes, I., Piña-Villalonga, J.M., Christie-Oleza, J.A., Peña, A., Bennasar, A., Armengaud, J., Nogales, B. and Bosch, R. 2012. Draft genome sequence of *Citreicella aestuarii* strain 357, a member of the *Roseobacter* clade isolated without xenobiotic pressure from a petroleum-polluted beach. *J. Bacteriol.* 194: 5464-5465.

Suárez-Suárez, L.Y. 2013. *Caracterización genómica y fisiológica de la capacidad de gradadora de hidrocarburos aromáticos de Citreicella aestuarii 357*. Doctoral Thesis. Universitat de les Illes Balears.

Ursing, J.B., Rossello-Mora, R.A., García-Valdés, E. and Lalucat, J. 1995. Taxonomic note: a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 604.

Winter, G. and Krömer, J.O. 2013. Fluxomics - connecting 'omics analysis and phenotypes. *Environ. Microbiol.* 15: 1901-1916.

Yilmaz, S. and Singh, A.K. 2012. Single cell genome sequencing. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23: 437-443.